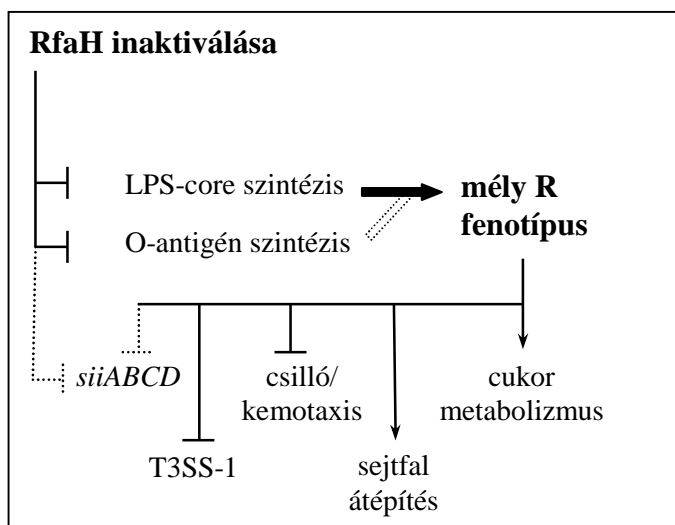


## Szakmai zárójelentés

A kutatási terv 1. pontjának megfelelően microarray technikával meghatároztuk a *Salmonella* RfaH regulont. Egy-egy prototípus *S. enterica* sv. Typhimurium (SL1344) illetve sv. Enteritidis (NCTC13349) törzs transzkriptómját hasonlítottuk össze izogén *rfaH* mutánsaik transzkriptómjával. A microarray vizsgálatokat a teljes *Salmonella* genomot tartalmazó ún. 'SALSA' chipeken végeztük kooperációban az Institute of Food Research (Norwich, UK) munkatársaival. Az eredmény (1. ábra) az LPS szintézisét kódoló gének és a 4-es számú *Salmonella* pathogenitási szigeten (SPI-4) elhelyezkedő *siiABCDEF* operon RfaH által történő közvetlen regulációját mutatták ki. Ezenkívül számos egyéb virulencia faktor (hármastípusú szekréciós rendszer /T3SS-1/, csilló/kemotaxis rendszer és sejtfal szintézis) csökkent expresszióját igazoltuk az *rfaH* mutánsokban. Utóbbi különbségek azonban az RfaH hiányában kialakuló 'mély R' LPS fenotípus indirekt következményének tekinthetők, amit egy strukturális LPS mutáns (*waaG*) transzkriptómjának egyidejű meghatározásával igazoltunk (Nagy et al., 2006).



1. ábra. RfaH direkt és indirekt hatásai a *Salmonella* transzkriptómra

Mivel az RfaH LPS-szintézisre kifejtett - már ismert - hatásán kívül a *sii* lókuszt volt az egyetlen operon, melynek átíródását az RfaH közvetlen módon befolyásolta, a későbbiekben ezen operon funkcióját vizsgáltuk. A *siiABCDEF* szakasz által kódolt géntermékek szerepe nem volt ismert, de a pathogenitási szigeten való lokalizációjából feltehető volt, hogy szerepet játszhat a *Salmonella* virulenciájában. *S. enterica* sv. Typhimurium és Enteritidis prototípus törzseiből létrehoztunk olyan deléciós mutánsokat, amelyekben a teljes operon (mind a hat

gén) hiányzik. Továbbá *S. Typhimurium* esetében hat olyan mutánst is kreáltunk, amelyekben a SPI-4 egy-egy génjét inaktiváltunk. Mivel a mutációk nem okoztak poláris hatást az operonon belül, lehetőségünk nyílt arra, hogy az egyes gének szerepét elkülönítve vizsgáljuk.

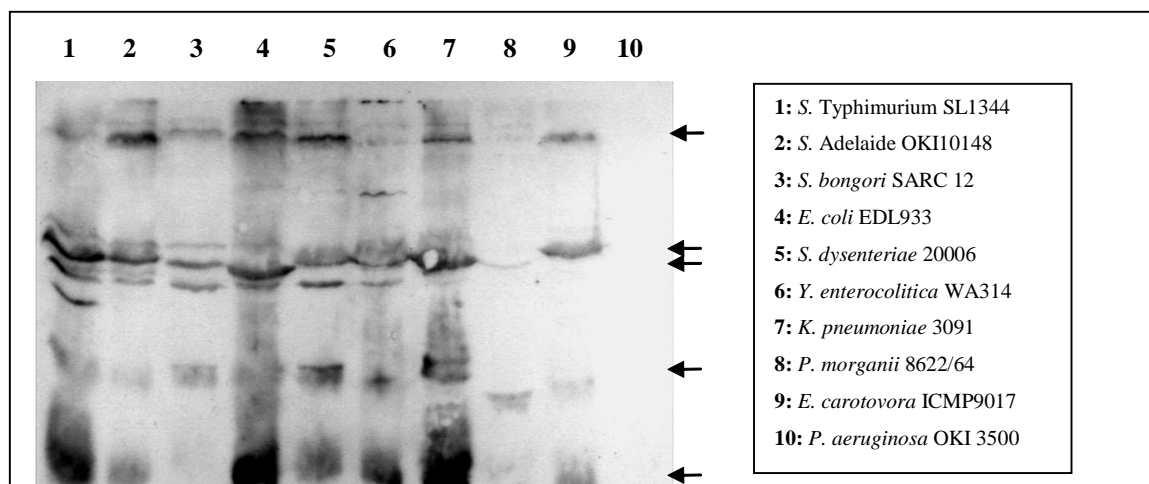
Az egér tífusz modellben vizsgáltuk a SPI-4 szerepét a virulenciára. Bizonyítottuk, hogy mindkét vizsgált szerotípus esetén a pathogenitási sziget elvesztése kismértékű (de statisztikailag szignifikáns) emelkedést eredményezett az 50%-os letális dózis (LD<sub>50</sub>) értékében, vagyis a SPI-4 szerepet játszik a virulenciájukban (Kiss et al., 2007). Ezt megerősítik ko-infekciós kísérleteink, melyekben a kísérleti állatokat olyan vegyes inokulummal fertőztük, amely a szülő vad típusú törzset és ennek izogén SPI-4 deléciós mutánsát egyenlő csíraszámban tartalmazta. Ebben a modellben nem a letális hatást vizsgáltuk, hanem a meghatározott időben leölt állatok szerveiben (máj, lép és Peyer plakkok) határoztuk meg a vad típus és a mutáns baktériumok arányát. A fertőzéstől számított idő függvényében a vad típusú baktérium túlnőtte a SPI-4 mutánsokat, ezzel igazolva azok csökkent virulenciáját. Ebben a modellben igazoltuk továbbá, hogy mind a hat SPI-4-et alkotó *sii* gén szerepet játszik a virulenciában (Kiss et al., 2007).

Kooperációt kezdeményeztünk Dr. Eirwen Morgan-nel (Institute for Animal Health, Compton, UK), aki leírta (Morgan et al., 2007), hogy a SPI-4 egy ~ 600 kDa nagyságú szekretált fehérje (SiiE) szintéziséért felelős. Az egyes génekben deléciót szenvedett mutánsainkból és ezek tenyészetek felülúszójából fehérjéket preparáltunk, majd Western blottot végeztünk SiiE-specifikus antitestek felhasználásával. Ily módon, a SiiE fehérje szintek meghatározásával igazolni tudtuk, hogy csak az operon négy disztális génje (*siiCDEF*) játszik szerepet a fehérje expressziójában, a *siiA* és *siiB* mutánsokban a fehérje szekrécija a vad törzséhez hasonló (Kiss et al., 2007). Mivel in vivo vizsgálataink alapján ezek a mutánsok szintén attenuáltak (l. fent), további kísérleteket tervezünk annak vizsgálatára, hogy a proximális gének által kódolt fehérjék milyen módon befolyásolják a *Salmonella* törzsek virulenciáját.

Az *rfaH* mutánsok virulenciája lényegesen nagyobb mértékben csökkent (Nagy et al., 2004), mint az izogén SPI-4 mutánsoké. Fentiek figyelembevételével tehát azt a következtetést vontuk le, hogy a *Salmonella rfaH* vakcina jelöltek attenuációjáért elsősorban az LPS-szintézisre gyakorolt regulációs hatás kiesése a felelős. Igazoltuk, hogy kommenzális és patogén *Escherichia coli* törzsek esetében az RfaH kiesése az intesztinális kolonizációt

nagymértékben érinti (Nagy et al., 2005). Hasonló mechanizmust feltételezhetünk *Salmonella* kórokozók esetében is. Emellett szövettényeszetek felhasználásával igazoltuk, hogy az *rfaH* mutánsok csökkent virulenciájának hátterében a baktériumok intracelluláris replikációjának csökkenése áll. Igazoltuk, hogy ez a károsodás az eukaryota sejtekben is előforduló antimikrobiális hatású kationos peptidek iránti fokozott érzékenységen alapul. Számos különböző izogén LPS mutánsal végzett összehasonlítás során bizonyítottuk, hogy a peptidek iránti fokozott érzékenység elsősorban az LPS-core szintézisének károsodásán alapul (Nagy et al., 2006).

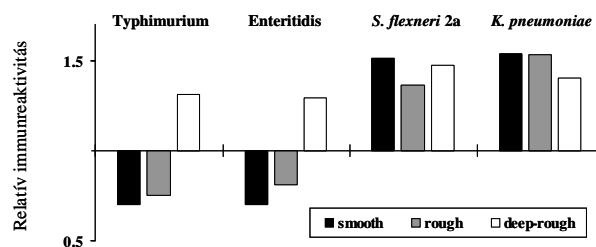
A kutatási terv 2. pontjának megfelelően igazoltuk, hogy az *rfaH* mutánsal való immunizálás során heterológ *Salmonella* szerovariánsokkal és egyéb bélbaktériumokkal kereszt-reagáló ellenanyagok termelődnek. Western blot technika alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a kereszt-reaktivitás hátterében számos konzervált külső membrán fehérje áll (2. ábra).



**2. ábra. Konzervált kereszt-reagáló külső membrán fehérjék kimutatása *rfaH* immun-szérum felhasználásával Western blot technikával**

Az ellenanyagok által felismert konzervált külső membrán fehérjék meghatározására kooperációt kezdeményeztünk a Greifswald-i Egyetem Mikrobiológiai Intézetével, amely a proteomikai kutatások élenjáró intézete. A kollaboráció során immunológiai módszerekkel preparáltuk ki az immunsavóval reagáló különböző bélbaktériumból származó külső membrán fehérjéket. Tömegspektroszkópiás módszerekkel ki tudtuk mutatni, hogy egyes major és minor porinok, valamint lipoproteinek orthológjai felelősek az in vitro kereszt-reaktivitásért (Nagy et al., submitted).

Feltételeztük, hogy e konzervált fehérjék immunogenitása magasabb lehet egy LPS mutánsban, mint egy intakt LPS-sel rendelkező vakcina törzsben. Hipotézisünk ezt az LPS O-antigén mint a legfőbb immunogén struktúra elvesztésével magyarázta. Feltételezéseinket izogén *rfaH* és *aroA* (attenuált, de intakt LPS-sel rendelkező vakcina törzs) *Salmonella* mutánsokkal történő immunizálás során nyert immunsavók reaktivitásának összehasonlításával igazoltuk. Az ELISA tesztek során különböző LPS fenotípussal rendelkező homológ és heterológ baktériummal reagáltattuk az immunsavókat. A 3. ábrán a szérumok reaktivitásának arányát tüntettük fel (*rfaH:aroA*). Az eredmények jól mutatják, hogy az *rfaH* immunsavó reaktivitása magasabb heterológ törzsekkel szemben. Másrészt homológ törzsekkel szemben a *rfaH*-savó reaktivitása megnő abban az esetben, ha a LPS amputációja megtörténik a céltörzsben (deep-rough /mély-R/ mutánsok). Vagyis ezen kísérletekkel igazoltuk feltételezésünket, miszerint más vakcina törzsekkel összehasonlítva a konzervált fehérje antigének immunogenitása megnő az *rfaH* mutánsban (Nagy et al., submitted). Az *rfaH* (és egyéb LPS) mutánsok vakcinálás szempontjából igen előnyös tulajdonságát két jelenleg közlés alatt álló összefoglaló publikációban részletesen tárgyaljuk (Nagy and Pal, 2008; Nagy et al., 2008)



3. ábra. *rfaH* és *aroA* immun-savók reaktivitásának összehasonlítása.

Azonos hígítású szérum minták ELISA-ban vizsgált reaktivitásának aránya (*rfaH:aroA*) különböző célsejten vizsgálva

Állatkísérletekkel igazoltuk, hogy az *rfaH* mutánsokkal történő vakcináció védeltséget nyújt heterológ *Salmonella* szerocsoportokkal szemben. *S. Typhimurium*mal immunizált egerek védetté váltak *S. Enteritidis* eger-virulens törzseivel szemben, és fordítva: *S. Enteritidis*-szel történő vakcinálás védeltséget nyújtott *S. Typhimurium*mal szemben is (Nagy et al., submitted). Folyamatban vannak olyan állatkísérletek, amelyek a *Salmonella rfaH* mutánsokkal való vakcinálás különböző bélbaktériumokkal szembeni kereszt-védeltséget biztosító hatását vizsgálják.

A kutatási terv 3. pontjában megfogalmazott heterológ antigének *Salmonella rfaH* mutánsban történő expressziója nem volt sikeres, mivel az *E. coli*-ból származó  $\alpha$ -hemolysint kódoló génszakaszt nem tudtuk sikeresen expresszálni *Salmonella* törzsekben. Ennek háttere nem tisztázott, de ez minden további klónozási kísérletet értelmetlenné tett volna. Ezek ismeretében kutatásaink e vonalát nem folytattuk.

Az OTKA támogatás segítségével beállított állatmodellek és molekuláris biológiai eljárások segítségével számos nemzetközi kooperációban megvalósuló kutatási projektbe kapcsolódtunk be. Ezek keretében az LPS és - az RfaH mellett egyéb - globális virulencia regulátorok virulenciában betöltött szerepét vizsgáltuk (Blumer et al., 2005; Brzuszkiewicz et al., 2006; Mansson et al., 2007; Muller et al., 2006). Mivel ezek eredménye jórészt közlemények formájában megjelent, másrészt szorosan nem kapcsolódik jelen kutatási projekthez, ezek részletes ismertetésétől itt eltekintek.

#### References

- Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emody, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V.F., and Unden, G. (2005). Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology* 151, 3287-3298.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 12879-12884.
- Kiss, T., Morgan, E., and Nagy, G. (2007). Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol. Lett.*
- Mansson, L.E., Kjall, P., Pellett, S., Nagy, G., Welch, R.A., Backhed, F., Frisan, T., and Richter-Dahlfors, A. (2007). Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 75, 997-1004.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S., and Stevens, M.P. (2007). SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Pathogenicity Island 4 (SPI-4) -encoded secretion system and contributes to intestinal colonization of cattle. *Infect. Immun.*
- Muller, C.M., Dobrindt, U., Nagy, G., Emody, L., Uhlin, B.E., and Hacker, J. (2006). Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 5428-5438.
- Nagy, G., Danino, V., Dobrindt, U., Pallen, M., Chaudhuri, R., Emody, L., Hinton, J.C., and Hacker, J. (2006). Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect. Immun.* 74, 5914-5925.

- Nagy, G., Dobrindt, U., Grozdanov, L., Hacker, J., and Emody, L. (2005). Transcriptional regulation through RfaH contributes to intestinal colonization by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* *244*, 173-180.
- Nagy, G., Dobrindt, U., Hacker, J., and Emody, L. (2004). Oral immunization with an RfaH mutant elicits protection against salmonellosis in mice. *Infect. Immun.* *72*, 4297-4301.
- Nagy, G., Emödy, L., and Pal, T. (2008). Strategies for the development of broad-protective vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* In Press.
- Nagy, G., and Pal, T. (2008) Lipopolysaccharide: a tool and target in enterobacterial vaccine development. *Biol. Chem.* In Press. DOI: 10.1515/BC.2008.XXX
- Nagy, G., Palkovics, T., Otto, A., Kusch, H., Kocsis, B., Dobrindt U., Engelmann, S., Hecker, M., Emödy, L., Pal, T., and Hacker J. "Gently rough": vaccine potential of a *Salmonella enterica* lipopolysaccharide regulatory mutant. Submitted.